Untersuchungen über Östronschwefelsäure, ein physiologisches Ausscheidungsprodukt des Östron

Von

Heinrich Hofstetter

1939

Druck: Dr. W. u. E. Brönner, Potsdam-Babelsberg

N 64

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41550804_0140

Untersuchungen über Östronschwefelsäure, ein physiologisches Ausscheidungsprodukt des Östron

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

genehmigt von der mathematisch-naturwissenschaftlichen

Fakultät der Friedrich - Wilhelm - Universität zu Berlin

Vorgelegt von

Heinrich Hofstetter

aus Freiburg (Breisgau)

Tag der mündlichen Prüfung: 28. Juni 1939

Tag der Promotion: 18. Oktober 1939.

1939

Druck: Dr. W. u. E. Brönner, Potsdam-Babelsberg

Referenten:

Prof. Dr. A. Butenandt

Prof. Dr. H. Leuchs

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

Die vorliegende Arbeit wurde vom Mai 1937 bis Februar 1939 unter Leitung von Herrn Prof. Dr. *A. Butenandt* im Kaiser-Wilhelm-Institut für Biochemie in Berlin-Dahlem ausgeführt.

Herrn Prof. *Butenandt* danke ich herzlichst für das Interesse und die Unterstützung, die er meiner Arbeit zuteil werden ließ.

Herrn Dr. *K. Tschernings* danke ich für seine stete Hilfsbereitschaft, Herrn Dr. *H. Dannenberg* für die Ausführung der Ultraviolett-Absorptionsmessungen, Fräulein *D. von Dresler* und Fräulein *U. Meinerts* für die Ausführung der Tierversuche.

Der Firma *Schering A.G.* bin ich für die Überlassung und Beschaffung von Ausgangsmaterial zu Dank verpflichtet.

Während die Kenntnis vom chemischen Aufbau der Steroidhormone bereits sehr weit fortgeschritten ist, ist über die Art, in der diese Verbindungen sich in den Zellstoffwechsel einschalten, fast nichts bekannt. Man weiß nicht, in welcher Form die Hormone von dem Ort ihrer Entstehung an den Ort ihrer Wirkung gelangen; es ist lediglich bekannt, daß sie als wasserlösliche Verbindungen im Harn ausgeschieden werden. Die Kenntnis des Aufbaus dieser wasserlöslichen Verbindungen ist nun aus dem Grunde wünschenswert, weil es möglich ist, daß die Hormone sich in Form ähnlicher oder entsprechender Verbindungen im Körper verteilen und daß man auf diesem Wege vielleicht zu einem Einblick in den Wirkungsmechanismus der Hormone gelangt. Von den beiden bisher aus Schwangerenharn isolierten wasserlöslichen Hormonverbindungen dürfen die Pregnandiolglucuronsäure (1) lediglich als Ausscheidungsform des Progesterons zu betrachten sein, denn in ihr ist der Steroidanteil in einer veränderten, unwirksamen Form vertreten. Ähnlich dürften die Verhältnisse bei der Östriolglucuronsäure (2) liegen, wobei aber die Einschränkung zu machen ist, daß man, solange über die Rolle des Östriols im Hormonhaushalt noch keine Klarheit herrscht, nicht von einer verringerten physiologischen Wirksamkeit des Steroidanteils sprechen kann.

Bei der wasserlöslichen Östronverbindung, als welche dieses Hormon sowohl im Harn trächtiger Stuten wie auch im Schwangerenharn auftritt, sind insofern andere Voraussetzungen gegeben, als man aus dieser Verbindung das physiologisch hochwirksame Hormon durch einfache Hydrolyse erhält. Da auch das im Serum trächtiger Stuten enthaltene Östron in wasserlöslicher, gebundener Form vorliegt, scheint es also möglich, daß das Östron in derselben Form, in der es ausgeschieden wird, auch im Organismus verteilt wird, und daß diese Verbindung eine Rolle im Wirkungsmechanismus des Östrons spielt.

Es war das Ziel der vorliegenden Arbeit, die Natur der wasserlöslichen Östronverbindung aufzuklären und darüber hinaus auch Beiträge zur Untersuchung der Frage zu liefern, ob diese Verbindung für die Umsetzung des Östrons im Organismus von Bedeutung ist.

Bisher erschienene Arbeiten

Daß Östron in Form wasserlöslicher Verbindungen ausgeschieden wird, wurde zuerst von *Marrian* (3) und von *Doisy* (4) und Mitarbeiter dadurch festgestellt, daß man durch Hydrolyse des Ausgangsmaterials erheblich größere Ausbeuten bei der Aufarbeitung erzielen konnte. *Cohen* und *Marrian* (5) untersuchten dann eingehend die günstigsten Bedingungen für die Hydrolyse und fanden, daß nach Erhitzen der auf $p_H = 1$ ge-

brachten Lösung auf 120°, also nach einer sauren Hydrolyse die besten Ergebnisse erzielt wurden.

Mühlbock (6) fand, daß auch im Serum der trächtigen Stute das Östron in gebundener Form vorliegt.

1936 veröffentlichten *Venning* und *Browne* (1) eine Arbeit, in der sie die gelungene Isolierung einer Steroidhormonverbindung aus Schwangerenharn, der Pregnandiolglucuronsäure mitteilten, die nach einem verhältnismäßig einfachen Trennungsgang als krystallisiertes Na-Salz zu gewinnen ist. Im gleichen Jahre gelang *Cohen* und *Marrian* (2) die Isolierung der wasserlöslichen Östriolverbindung, die nach einem sehr umständlichen Verfahren gleichfalls als Na-Salz des Glucuronids aus Schwangerenharn erhalten wurde.

Der Trennungsgang wurde später von denselben Autoren etwas verbessert (2a), er blieb aber trotzdem noch recht kompliziert.

Den ersten Hinweis auf die Zusammensetzung der wasserlöslichen Verbindung des Östrons gibt eine Arbeit von *Schachter* und *Marrian* (7), die aus dem Butanolextrakt vom Harn trächtiger Stuten eine wasserlösliche Östronverbindung mit etwa 40% Östrongehalt erhielten. Diese Substanz enthielt keine Glucuronsäure, gab aber eine positive Reaktion auf SO_4''. Dieser Befund deutet darauf hin, daß das Östron mit Schwefelsäure verestert ausgeschieden wird, eine Annahme, die auch deshalb besonders wahrscheinlich ist, weil Schwefelsäureester phenolischer oder phenolähnlicher Verbindungen zu den regelmäßig anzutreffenden Bestandteilen des Harns zu rechnen sind.

Für Versuche zur Anreicherung von Hormonen der Östrongruppe hat sich als Hilfsmittel vielfach die für diese Stoffe kennzeichnende Farbreaktion, die Rotfärbung der Lösung des Hormons in heißer, konzentrierter, phenolhaltiger Schwefelsäure bei dem Verdünnen mit Wasser, bewährt. Diese Reaktion wurde zuerst von *Kober* (8) beobachtet und zur quantitativen Bestimmung des Hormons vorgeschlagen. Von *Cohen* und *Marrian* (9) wurde die Bestimmungsmethode weiter entwickelt und schließlich wieder von *Kober* (10) zu einer sehr brauchbaren quantitativen Bestimmung des Östrons ausgearbeitet. In der von *Kober* beschriebenen Form wurde die Methode auch für die Östronbestimmungen der vorliegenden Arbeit herangezogen.

Für die weiteren Versuche zur Charakterisierung der wasserlöslichen Östronverbindung konnten zwei Wege eingeschlagen werden. Man konnte einmal den von *Marrian* beschrittenen Weg der Fraktionierung der Butanolauszüge aus Stutenharn weiter verfolgen und versuchen, zu einer einheitlichen, wasserlöslichen Substanz mit konstantem Östrongehalt zu gelangen und die Zusammensetzung dieser Verbindung ermitteln. Dieser Weg wurde, nachdem festgestellt worden war, daß auch im Schwangerenharn die östronhaltigen Fraktionen stets SO_4'' enthielten, zunächst verlassen. Er wurde von *Schachter* und *Marrian*, wie später noch ausgeführt werden wird, weiter verfolgt.

Der in vorliegender Arbeit eingeschlagene Weg macht von der Tatsache Gebrauch, daß Schwefelsäureester von Phenolen synthetisch ziemlich leicht zugänglich sind. Da Östron sich außerdem nur in einer Art mit Schwefelsäure verestern läßt, muß die synthetisch dargestellte Verbindung mit der in der Natur vorkommenden identisch sein, wenn in dieser tatsächlich der Östronschwefelsäureester vorliegt. Man kann an der synthetischen Verbindung Löslichkeit, Verteilbarkeit zwischen Lösungsmitteln und Fällbarkeit, also die Eigenschaften, die für die Ausarbeitung eines Trennungsgang von Bedeutung sind, kennenlernen. Darüber hinaus kann man sich, wenn die Identität erwiesen ist, auch für physiologische Versuche stets beliebig viel Substanz bereiten; dies ist von großem Vorteil, weil Phenolschwefelsäureester ziemlich zersetzlich sind, und man also niemals sicher ist, daß die Verbindung die vielen, oft sehr umständlichen Verfahren zu ihrer Isolierung aus natürlichem Ausgangsmaterial unverändert überdauert. Erst nachdem die Versuche zur synthetischen Darstellung des Östronschwefelsäureesters zum gewünschten Erfolg geführt hatten, wurden die Versuche zur Isolierung der Verbindung aus Schwangeren- und Stutenharn wieder aufgenommen. Während der Durchführung dieser Arbeiten erschien eine Mitteilung von *Schachter* und *Marrian* (11), deren weitere Bemühungen zur Isolierung von Östronschwefelsäureester aus dem Harn trächtiger Stuten schließlich zu dem Erfolg geführt hatten, daß aus einer Aufarbeitung einige Milligramm eines krystallisierten Kaliumsalzes gewonnen wurden, das nach Östron- und Schwefelsäuregehalt ein, wenn auch etwas verunreinigtes, Kaliumsalz des Östronsulfats darstellen dürfte.

Die synthetische Darstellung des Östronschwefelsäureesters und die Eigenschaften der Verbindung

Die Veresterung von Östron mit Schwefelsäure gelingt ohne Schwierigkeiten, wenn Östron in einem Gemisch von wasserfreiem Pyridin und Chloroform gelöst wird und zu diesem Gemisch eine Lösung der berechneten Menge Chlorsulfonsäure in Chloroform-Pyridin unter Kühlung hinzugefügt wird. Nach eintägigem Stehen bei Zimmertemperatur wird das Lösungsmittel unter vermindertem Druck abdestilliert und der Rückstand, ein rötlich-braunes Öl, durch Übergießen mit Äther und längeres Stehenlassen in der Kälte zum Erstarren gebracht. Durch Auflösen des Rückstandes in Methanol, Neutralisieren mit methylalkoholischer Natronlauge und fraktionierte Fällung der alkoholischen Lösung mit Äther gelangt man zu einer meist schon kristallinen Rohfällung des Natriumsalzes der Östronschwefelsäure. Bei Verwendung gut vorgetrockneter Lösungsmittel beträgt die Ausbeute dieser Rohfällung 70 bis 80% der Theorie. Die Reinigung der Verbindung wurde zunächst durch Umkrystallisation aus organischen Lösungsmitteln versucht. Sie gelingt aber auf diesem Wege nicht, weil meist schon nach kurzem Erwärmen der Lösung eine Zersetzung der Verbindung eingeleitet wird, die nach kurzer Zeit zum vollständigen Zerfall in Östron und Na-

Bisulfat führt. Die Reinigung wurde deshalb durch wiederholtes Umfällen aus Methanol-Äther durchgeführt, wobei die schwache Rosafärbung des Rohprodukts durch Behandeln der kalten methanolischen Lösung mit Tierkohle entfernt werden kann. Auf diesem Wege gelangt man zu farblosen Nadeln, die bei 228° bis 230° schmelzen. Man kann die Verbindung auch dadurch reinigen, daß man sie aus absolut methylalkoholischer Lösung an Aluminiumoxyd adsorbiert und nach Elution mit Methylalkohol mit viel Äther fällt. Bei diesem Verfahren sind jedoch die Substanzverluste recht groß. Da der Schmelzpunkt der Verbindung stets sehr unscharf war, wurde der Schmelzvorgang im Mikroschmelzpunktapparat von *Kofler* verfolgt. Hier zeigt sich, daß die Krystalle der reinen Verbindung bis etwa 200° unverändert bleiben. Oberhalb 200° beginnt eine allmähliche Verwitterung der Krystalle, der von ungefähr 220° an eine allmähliche Sinterung folgt. Von 228° an wird diese so schnell, daß sie bei makroskopischer Betrachtung als Schmelzvorgang erscheint. Neben der Sinterung tritt eine Neubildung von Krystallen auf, die aus dem bei der Zersetzung freiwerdenden Östron bestehen. Also auch bei trockenem Erhitzen zerfällt das Na-Östronsulfat in Östron und Na-Bisulfat. Das ist dadurch möglich, daß die Verbindung mit einem Mol Wasser krystallisiert, wie die Ergebnisse der Analyse zeigen. Die Verbindung zeigt in Methanol eine Drehung von $[\alpha]_D^{20}$: +110°.

Löslichkeit und Verteilung zwischen Lösungsmitteln

Von den Eigenschaften des Östronschwefelsäureesters hatten im Hinblick auf die Isolierung der Verbindung aus natürlichem Ausgangsmaterial ihre Löslichkeit und Verteilbarkeit zwischen verschiedenen Lösungsmitteln ein besonderes Interesse. In Wasser lösen sich die Krystalle des Na-Östronsulfats klar auf, sie sind ferner löslich in Alkoholen, besonders in Methanol, sowie in Aceton und Pyridin. Sehr wenig löslich ist die Verbindung in Essigester und Chloroform, unlöslich in Äther und Petroläther. Aus seiner wässrigen Lösung kann das Na-Östronsulfat also nicht durch die Lipoidlösungsmittel, wohl aber durch Butanol ausgeschüttelt werden. Der butanolischen Lösung wird es auch durch Waschen mit Natronlauge nicht mehr entzogen. Diese Eigenschaft ist wichtig für die Abtrennung der Verbindung aus Harn, weil sie eine große Menge von Verunreinigungen zu entfernen gestattet.

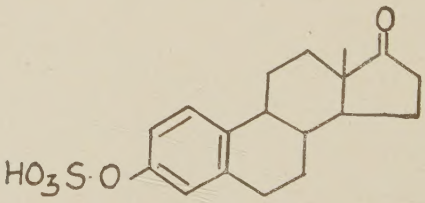
Beständigkeit des Na-Östronsulfats

Die Haltbarkeit des Östronschwefelsäureesters ist, wie die anderer Phenolschwefelsäureester, beschränkt. Die Krystalle des Na-Salzes zersetzen sich nach mehrtägigem Stehen an der Luft, was sich daran erkennen läßt, daß sich eine Probe der Substanz in Wasser nicht mehr klar löst. Bei Aufbewahrung im Exsiccator wird die Zersetzung jedoch merklich verzögert. In Lösung ist die Beständigkeit des Na-Östronsulfats stark von dem p_H des Lösungsmittels sowie von dessen Fähigkeit, H-Ionen ab-

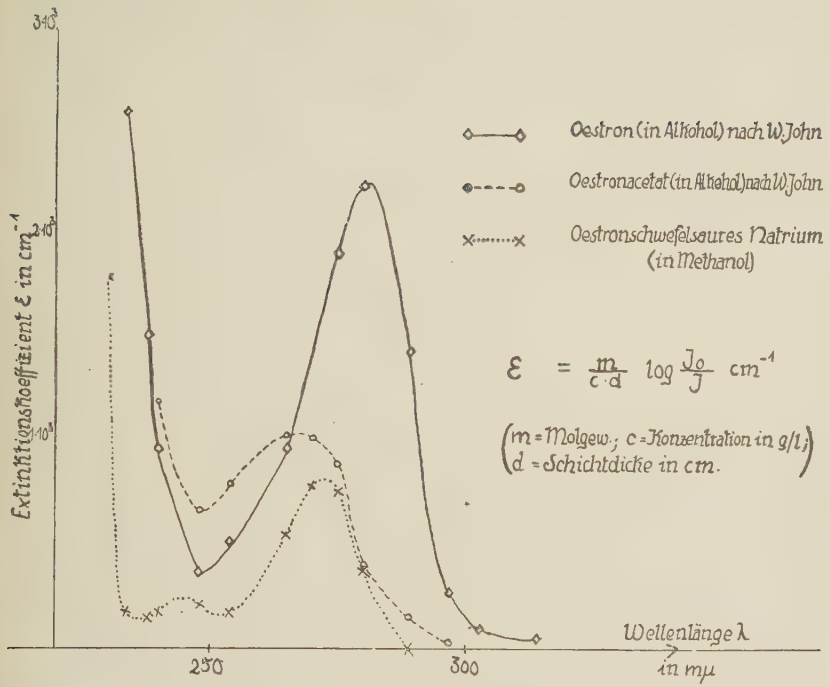
zufangen, abhängig. In saurer, wässriger Lösung tritt in der Kälte langsame, in der Hitze schnelle Spaltung des Esters ein; da sich bei der Zersetzung H-Ionen bilden, wird eine einmal begonnene Spaltung in neutraler Lösung autokatalytisch beschleunigt. Aus diesem Grunde spielt die Pufferung der Lösung eine große Rolle für deren Haltbarkeit. In alkoholischer und besonders in acetonischer Lösung ist das Na-Östronsulfat gegen Erwärmung recht empfindlich, so daß, wie schon erwähnt wurde, ein Umkrystallisieren aus organischen Lösungsmitteln nicht möglich ist.

Nachweis der Esternatur der Verbindung

Die große Empfindlichkeit der dargestellten Verbindung gegenüber Säuren weist schon darauf hin, daß es sich hier um einen Ester handelt. Der besondere Charakter des Östronsulfats als Phenolschwefelsäureester wird durch sein Verhalten gegenüber dem Enzym Phenolsulfatase (12) deutlich. Dieses ganz spezifisch auf Phenolschwefelsäureester eingestellte Enzym ist im Pflanzen- und Tierreich verbreitet. Im Säugetierorganismus ist es hauptsächlich in der Niere anzutreffen und spielt hier sicherlich bei der Ausscheidung von Phenolen und Indoxyl als Schwefelsäureester eine Rolle. Dieses Enzym, das in Form des aus Aspergillus Orycae gewonnenen Präparats „Takadiastase" verwendet wurde, vermag nun in neutraler, mit Bariumcarbonat gepufferter Lösung die Spaltung des Na-Östronsulfats sehr zu beschleunigen. Nach 16-stündiger Einwirkung des Enzyms bei 37° waren fast 90% des Östronsulfats gespalten, während im Vergleichsversuch ohne Enzym nur etwa 10% des Esters sich zersetzt hatten. Damit ist die Fähigkeit der Verbindung, als Substrat für die Phenolsulfatase zu dienen, erwiesen und somit auch ihre Natur als Phenolschwefelsäureester.



Daß die phenolische Hydroxylgruppe in der dargestellten Verbindung nicht mehr frei ist, kann auch durch die Absorption des Stoffes im Ultraviolett bestätigt werden. Das Absorptionsspektrum des Östronacetats unterscheidet sich in charakteristischer Weise von demjenigen des freien Östrons dadurch, daß das Maximum bei 280 mμ ganz erheblich an Intensität verliert (13). Das Absorptionsspektrum der dargestellten Östronschwefelsäureverbindung verläuft vollkommen analog demjenigen des Östronacetats. Es ist auch hiermit bestätigt, daß es sich um einen Ester handelt.



Figur 1: Ultraviolettabsorption von Östronschwefelsaurem Na im Vergleich zu derjenigen von Östron und Östronacetat nach W. John

Darstellung anderer Salze der Östronschwefelsäure

Die Darstellung weiterer Salze des Östronschwefelsäureesters sollte einmal dazu dienen, eine wasserfrei krystallisierende Verbindung, die zur Analyse geeignet ist, zu erhalten, weil die Analysenwerte für das Na-Salz keine ganz befriedigenden Werte ergeben hatten. Im P y r i d i n s a l z, das aus den Ansätzen zur Darstellung des Na-Salzes zuweilen vor dem Neutralisieren mit methanolischer Natronlauge auskrystillisierte, wurde eine Verbindung gefunden, deren Analyse gut auf das wasserfreie Salz stimmte. Das Pyridinöstronsulfat ist in Wasser ebenso löslich, wie das Na-Salz, in Methanol dagegen merklich schwerer. Es kann daher aus Methanol umkrystallisiert werden und wird dann in Nadeln vom Schmelzpunkt 173° bis 175° und einer Drehung von $[\alpha]_D^{23} := +84{,}1°$ erhalten.

Versuche, daraus die freie Säure zu isolieren, schlugen fehl, sicherlich schon aus dem Grunde, weil sich der Stoff infolge seiner sauren Eigenschaften selbst zersetzt. Auch die Versuche, den Ester zu methylieren, führten zu keinem Erfolg.

Um weitere Hilfsmittel zur Abtrennung des Östronsulfats aus Harn in die Hand zu bekommen, wurde sodann geprüft, ob die Östronschwefelsäure auch in Wasser schwer lösliche Salze zu bilden vermag. Unter den Metallsalzen befriedigte in dieser Hinsicht einigermaßen allein das Bariumsalz, obwohl auch dieses aus stärker verdünnten Lösungen nur unvollständig ausfällt. Versetzt man eine 0,2%ige Lösung von östronschwefelsaurem Na mit überschüssiger, gesättigter Bariumchloridlösung, so fällt ein amorpher, flockiger Niederschlag des Bariumsalzes, dessen Gewicht nach dem Trocknen nur etwas mehr als die Hälfte des zu erwartenden Wertes beträgt. Da das Bariumsalz jedoch in Butanol leicht löslich ist und sich eine Ausfällung durch Aussalzen der Lösung vervollständigen läßt, bot es doch gute Aussichten zur Verwendung bei einem Trennungsgang. Es hat sich später auch gezeigt, daß die Fällung mit Barium die einzige für den Trennungsgang praktisch verwendbare Fällungsreaktion ist.

Die Suche nach in Wasser schwer löslichen Verbindungen führte dann zur Fällung der Östronschwefelsäure mit Alkaloiden. Es wurden Strychnin, Brucin, Codein, Chinin, Chinidin, Chinchonin und Chinchonidin geprüft.

Alle diese Alkaloide bilden in Wasser ziemlich schwer lösliche Salze mit der Östronschwefelsäure, jedoch war die Fällung in keinem Falle quantitativ und auch die Krystallisationsfähigkeit der Salze war meist nur gering. Eine Ausnahme in dieser Hinsicht machte das Chinidinsalz, das durch Umkrystallisieren aus Methanol-Wasser bzw. Aceton-Wasser leicht in Form schöner Nadeln erhalten verden konnte. Nach der Analyse und nach der Östrongehaltsbestimmung mit Hilfe der Koberschen Farbreaktion enthält das unscharf bei 167° bis 170° schmelzende, krystallisierte Chinidinsalz 3 Mol. Krystallwasser, das auch durch scharfes Trocknen der Krystalle nur zum Teil entfernt werden kann. Das Salz des stereoisomeren Chinins ist dagegen unter keinen Umständen zur Krystallisation zu bringen und auch die Krystallisationsfähigkeit des Chinidinsalzes wird schon durch geringe Verunreinigungen so herabgesetzt, daß es in keinem Falle möglich war, aus Anreicherungen von natürlichem Ausgangsmaterial mit seiner Hilfe die Östronschwefelsäure in krystallisierter Form von Begleitstoffen zu trennen. Entsprechendes gilt auch für die anderen untersuchten Alkaloidsalze.

Im Gegensatz zu anderen Salzen der Östronschwefelsäure sind die Alkaloidsalze beständig, sie zersetzen sich auch bei längerem Stehen an der Luft nicht. Wenn die Alkaloidsalze infolge ihrer schlechten Krystallisationsfähigkeit zur Anreicherung und Reinigung von Östronsulfat auch nicht geeignet sind, so könnten sie doch bei der Aufarbeitung von Harn auf Östronsulfat dadurch von Nutzen sein, daß man zunächst aus einer größeren Menge Ausgangsmaterial durch Überführung in das Alkaloidsalz die östronsulfathaltigen Fällungen haltbar macht und auf diese Weise für die weitere Reinigung genügend Material sammelt. Zur Entfernung

des Alkaloids genügt es, die in alkalisch-wässriger Lösung verteilte Fällung mehrmals mit Äther auszuschütteln.

Darstellung des Östronschwefelsäure-Semicarbazons

Die Beständigkeit des Östronsulfats wird ebenfalls durch seine Überführung in das Semicarbazon sehr gesteigert. Das in absolutem Äthanol gelöste Na-Salz wird dazu mit einem Überschuß von alkoholischer Semicarbazidacetatlösung erhitzt und längere Zeit stehen gelassen. Nach dem Abkühlen hat sich ein Niederschlag abgeschieden, der in Alkohol sehr wenig, in Wasser mäßig löslich ist. Das Na-Salz des Semicarbazons zersetzt sich bei 258° bis 260°. Es wird aus der wässrigen Lösung durch Bariumchlorid als amorphes Ba-Salz gefällt, das durch Umkrystallisieren aus Methanol, in dem es etwas löslich ist, in Form feiner Prismen erhalten werden kann, die aber keinen definierbaren Schmelz- oder Zersetzungspunkt mehr haben. Oberhalb 270° tritt eine ganz allmähliche Zersetzung unter Braunfärbung ein, ohne daß sich dabei die Form verändert.

Als Hilfsmittel zur Isolierung von Östronsulfat aus Harn ist das Semicarbazon kaum geeignet, weil die Östronschwefelsäure daraus nicht zurückzugewinnen ist, denn bei der Spaltung des Semicarbazons durch Säure würde ja gleichzeitig auch die Esterbindung verseift. Die Verbindung zeigt weder ausgeprägte chemische Konstanten, noch läßt sie sich gut umkrystallisieren, so daß sie sich auch nicht zur Identifizierung des Östronsulfats eignet.

Anwendbarkeit der kolorimetrischen Östronbestimmung nach Kober auf den Schwefelsäureester des Östrons

Da für die späteren Anreicherungsversuche auch die quantitative Bestimmung des Östrons nach *Kober* (10) Anwendung finden sollte, wurde untersucht, ob diese Reaktion auch für den Schwefelsäureester des Östrons unmittelbar angewendet werden kann.

Diese Bestimmungsmethode ist seit ihrer ersten Anwendung durch *Kober* wiederholt abgeändert worden. Nach der letzten 1938 von *Kober* (10) veröffentlichten Vorschrift dient als Reagens eine 2%ige Lösung von β-Naphtol in konzentrierter Schwefelsäure, und eine 5- und 65%ige Schwefelsäure zum Verdünnen der Lösungen. Zur Zerstörung des Farbstoffes für die Restfarbbestimmung wird eine Lösung von 3% Wasserstoffperoxyd in 50%igem Alkohol verwendet.

Zur Bestimmung wird aus einer möglichst weit vorgereinigten östronhaltigen Lösung die einem Östrongehalt von 2 bis 10 γ entsprechende Menge in einem kleinen Reagensglas zur Trockne gebracht, der Rückstand mit 0,2 ccm des Naphtolreagens 2 Min. in einem Glycerinbad auf 100° erhitzt und dann in Eis gekühlt. Dann wird unter Eiskühlung mit 0,2 ccm der 5%igen Schwefelsäure verdünnt, nochmals 90 Sec. auf 100° oder 30 Sec. auf 120° erhitzt und danach wieder mit Eis gekühlt. Die

Farblösung kann nun entweder unmittelbar oder nach Verdünnung auf 1 ccm mit 65%iger Schwefelsäure zur Messung der Extinktion verwendet werden. Das Maximum der Absorption liegt bei einer Wellenlänge von 505 $m\mu$. Aus den erhaltenen Werten wird mit Hilfe einer Eichkurve, die mit Lösungen von bekanntem Östrongehalt hergestellt wird, die Menge des Östrons bestimmt. Zur Restfarbbestimmung werden nach *Kober* zwei Parallelbestimmungen ausgeführt, bei denen die Farblösung einmal mit 50%igem Aceton und das andere Mal mit der alkoholischen Wasserstoffperoxydlösung auf 1 ccm verdünnt wird. Aus der Differenz der erhaltenen Werte ergibt sich der wirkliche Östrongehalt. Die Bereitung der Farblösung aus dem östronhaltigen Material wurde im wesentlichen nach dieser Vorschrift *Kobers* durchgeführt. Die Extinktion der Lösung wurde mit dem „Leifo" unter Verwendung der Mikroapparatur und des Filters 510 gemessen. Dazu wurde die aus dem östronhaltigen Material, 0,2 ccm Naphtolreagens und 0,2 cm^3 Wasser bereitete Farblösung mit 65%iger Schwefelsäure auf 1 ccm verdünnt. Die Farbintensität bleibt in dieser Lösung über 5 Min. praktisch konstant, so daß bei der Ablesung im Photometer der Zeitfaktor keine wesentliche Rolle spielt. Bei Verdünnung mit 50%igem Aceton verändert sich die Intensität der Farbe aber schnell, so daß man hierbei die Ablesung nach einer ganz bestimmten Zeit vornehmen muß. Die Restfarbbestimmung wurde ein wenig vereinfacht, indem zur Messung 0,5 ccm der Farblösung in einem Reagensglas mit 0,5 ccm der Wasserstoffperoxydlösung vermischt und die Extinktion nach 5 min. bei doppelter Schichtdicke gemessen wurde. Man kommt so mit der Herstellung nur einer Lösung aus. Die Reaktion wurde zuerst mit Lösungen von reinem Östron geprüft und dabei festgestellt, daß bei der verwendeten Apparatur die untere Erfassungsgrenze bei 2 γ Östron liegt, jedoch erhält man erst oberhalb von 4 γ zuverlässige Werte, die stets innerhalb der Fehlergrenze von $\pm 5\%$ lagen.

Nach Herstellung einer Eichkurve mit Lösungen von reinem Östron wurden Lösungen von reinem Na-Östronsulfat und reinem Chinidinöstronsulfat untersucht. Dabei wurde gefunden, daß die ermittelten Werte gut mit den berechneten übereinstimmten. Die Methode ist also grundsätzlich für Bestimmungen des Östronschwefelsäureesters direkt anwendbar. Über die Grenzen, die der Methode praktisch gesetzt sind, wird bei der Besprechung der Versuche zur Anreicherung des Östronsulfats aus Harn zurückzukommen sein.

Vergleich der physiologischen Wirksamkeit des Östronsulfats mit derjenigen des freien Östron und der anderen Östronester

Während die bei der kolorimetrischen Bestimmung erhaltenen Werte dem Östrongehalt der Verbindungen entsprechen, ist im physiologischen Test das Östronsulfat dem freien Hormon nicht vergleichbar. Es zeigt sich nämlich, daß die Veresterung des Östrons mit Schwefelsäure eine

sehr starke Verminderung seiner östrogenen Wirksamkeit hervorruft. Das Natriumsalz des Östronsulfats ist im Allen-Doisy-Test an der kastrierten Maus erst in einer Dosis von 10 γ voll wirksam, das heißt das in der Verbindung enthaltene Östron hat noch nicht einmal 2% seiner Wirksamkeit in freiem Zustand. Dabei ist es fast ohne Einfluß, ob die Verbindung in öliger Lösung oder Ringerlösung injiziert oder ob sie in wässriger Lösung oral gegeben wird. Ebenfalls mit 10 γ ist auch das Chinidinsalz wirksam, das bedeutet jedoch, da die Verbindung weniger Östron enthält, eine Steigerung auf 3% der Wirksamkeit des freien Östrons. Diese Steigerung ist vielleicht durch die veränderte Resorbierbarkeit infolge der Schwerlöslichkeit des Chinidinsalzes bedingt.

Merklich höher wirksam ist das Pyridinsalz, bei dem außerdem die Wirksamkeit auch davon abhängig ist, auf welche Art der Stoff verabfolgt wird. Bei Injektion in öliger Lösung erreicht das Pyridinöstronsulfat mit einer Grenzdosis von 1 γ 15 bis 20% der Wirksamkeit des freien Östrons. Bei Injektion in Ringerlösung sinkt die Wirksamkeit auf 2 γ und bei oraler Verabfolgung schließlich sind 3 γ nötig, um die Vollbrunstreaktion auszulösen. Doch auch in diesem Fall ist das Pyridinsalz noch dreimal wirksamer als das Na-Salz.

Als Grund für diese Erscheinung ist vielleicht die leichtere Spaltung zu freiem Östron anzunehmen.

Der Schwefelsäureester verhält sich also hier durchaus anders, als etwa das Acetat oder das Benzoat des Östrons (14), deren Wirksamkeit mit der des freien Hormons vergleichbar ist oder sie sogar übertrifft. Der Grund für die starke Verminderung der Wirksamkeit gegenüber dem freien Hormon dürfte vor allem darin zu suchen sein, daß die Verbindung als Ausscheidungsform des Östrons sehr schnell aus dem Kreislauf entfernt wird. Eine protrahierte Wirksamkeit war unter diesen Umständen nicht zu erwarten und wurde auch nicht beobachtet.

Verhalten des Östronschwefelsäureesters gegenüber gärender Hefe

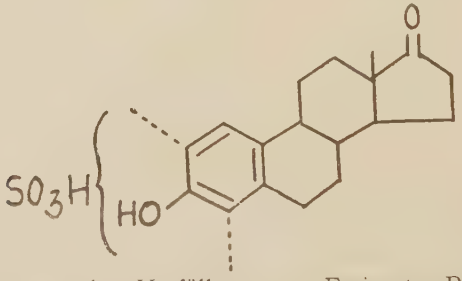
Ein weiterer Hinweis darauf, daß sich das Östronsulfat unter physiologischen Bedingungen anders verhält als die bisher bekannten Ester des Östrons, wird durch einen Versuch gegeben, der in Anlehnung an *Mamolis* (15) Versuche über die Einwirkung gärender Hefe auf die Ester des Östrons unternommen wurde. Während das Acetat und das Propionat des Östrons durch gärende Hefe unter Spaltung der Esterbindung hydriert werden, so daß man hauptsächlich Östradiol aus den Ansätzen zurückgewinnt, das Benzoat dagegen weder verseift noch hydriert wird, verhält sich Östronsulfat abweichend.

Das Östronsulfat wird unter den gleichen Versuchsbedingungen anscheinend nur langsam angegriffen, was bei seiner großen Zersetzlichkeit überraschend ist. Es zeigt sich, daß der Schwefelsäureester in gepufferten

Lösungen in Abwesenheit von Phenolsulfatase recht beständig sein kann. In zwei bisher unternommenen Versuchen wurden in den den freien Hormonen entsprechenden Fraktionen nur ganz geringe Spuren östrogener Substanz gefunden, während in der dem unveränderten Östronsulfat entsprechenden Fraktion ein Teil des Substrats anscheinend unverändert wiedergefunden wurde. Zur Klärung dieser Erscheinung bedarf es noch weiterer Versuche.

Darstellung der Östronsulfosäure

Bei den Versuchen, zur freien Östronschwefelsäure zu gelangen, die infolge der Empfindlichkeit der Esterbindung gegenüber H-Ionen wie bereits erwähnt, erfolglos blieben, wurde noch eine andere Schwefelsäureverbindung des Östrons erhalten. Läßt man nämlich Chlorsulfonsäure unter Ausschluß von Pyridin auf eine Lösung von Östron in Chloroform einwirken, so färbt sich das Reaktionsgemisch unter Trübung sogleich tiefrot. Ein Zusatz von ganz wenig Äther verhindert diese Rotfärbung und Trübung vollständig, ohne den eigentlichen Verlauf der Umsetzung zu zerstören. Wird eine Lösung von Östron in Chloroform-Tetrachlorkohlenstoff nach Zugabe der berechneten Menge Chlorsulfonsäure und einer Spur Äther auf dem Wasserbade gekocht und vom Lösungsmittel befreit, so hinterbleibt ein bräunlichroter Rückstand, der sich in Essigester zunächst mit roter Farbe auflöst. Die Rotfärbung blaßt dabei, besonders unter der Einwirkung von Licht, bald aus und kann auch durch Behandeln der Lösung mit Tierkohle leicht entfernt werden. Fällt man die Essigesterlösung mit Petroläther (80 bis 90°), so entsteht ein feinkrystalliner, farbloser Niederschlag einer in Wasser sehr leicht löslichen Östronverbindung, die eine Östronsulfonsäure darstellt.



Durch Wiederholung der Umfällung aus Essigester-Petroläther erhält man den Stoff in winzigen Krystalldrusen vom Schmelzpunkt 202° bis 204°. Dieser Schmelzpunkt ist noch nicht konstant. Er kann durch weiteres Umfällen noch erhöht werden, sinkt aber bei zu häufiger Wiederholung des Verfahrens wieder, wahrscheinlich infolge einer zu starken Wasseranziehung der Krystalle. Entsprechend der Schwierigkeit, zu einer durch den Schmelzpunkt scharf gekennzeichneten Verbindung zu kommen, waren auch die Analysenwerte unbefriedigend, sie deuten auf einen Wassergehalt

der Krystalle von 1 bis 2 Mol hin. Daß es sich bei der Verbindung um eine Sulfonsäure des Östrons handelt, wurde folgendermaßen sichergestellt:

1. Im Gegensatz zum Schwefelsäureester läßt sich die Verbindung weder in saurer noch in alkalischer Lösung hydrolysieren.
2. Das Absorptionsspektrum im Ultraviolett zeigt einen Verlauf, der demjenigen des freien Östrons entspricht, die phenolische Hydroxylgruppe ist also frei. (Vergleiche Fig. 2.)

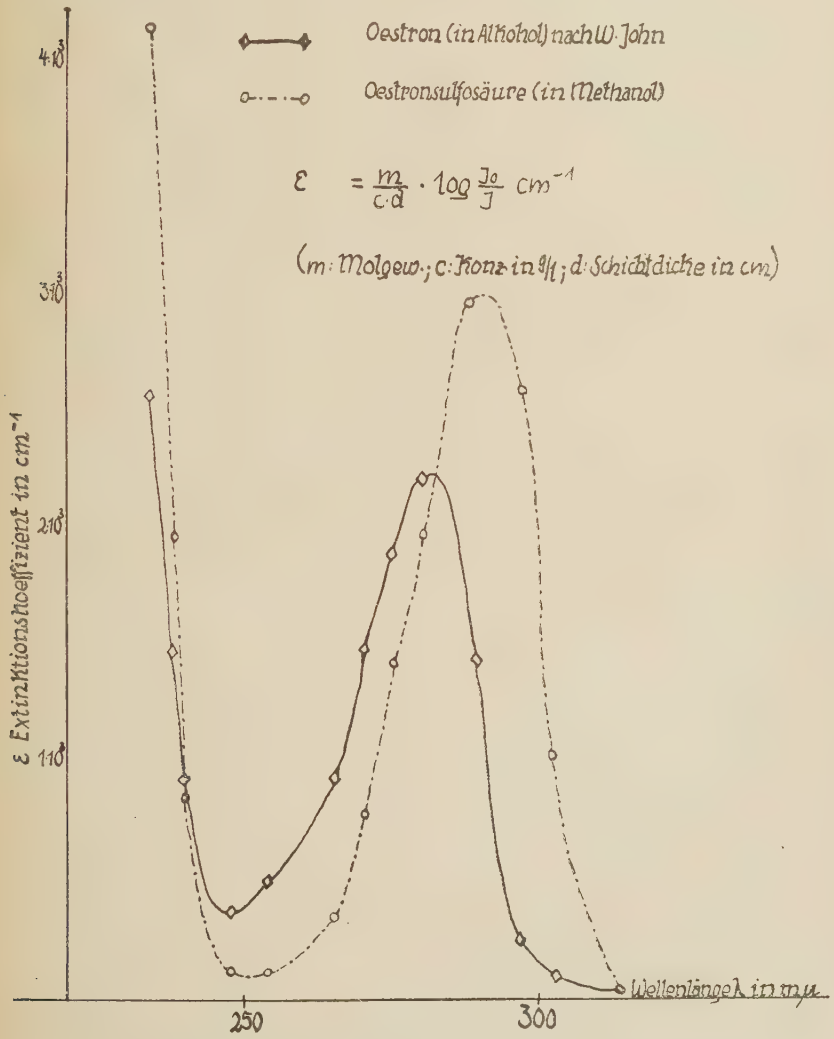


Fig. 2. Ultraviolettabsorption von Östron und Östronsulfonsäure

3. Dies wird auch durch die Methylierung der Verbindung bestätigt, die bei Verwendung von überschüssigem Diazomethan zur Einführung von zwei Methylgruppen führte. Die Dimethylverbindung krystallisiert aus Methanol in glänzenden rhombischen Blättchen vom Schmelzpunkt 197° und 207°. Nach dem Ergebnis der Analyse enthält diese Verbindung kein Krystallwasser mehr.

Die Östronsulfonsäure ist in Wasser, Alkoholen und Aceton sehr leicht, in Essigester mäßig und als freie Säure auch in Äther ein wenig löslich. Sie kann daher aus viel Äther umkrystallisiert werden und scheidet sich dann in feinen Nadeln ab, die aber erheblich tiefer schmelzen, als das aus Essigester-Petroläther gereinigte Produkt. Die Fällbarkeit der Sulfonsäure aus wässriger Lösung durch Alkaloide ist ähnlich derjenigen des Östronschwefelsäureesters, jedoch unterscheiden sich die Alkaloidsalze in ihrer Kystallisationsfähigkeit von den entsprechenden Verbindungen des Östronsulfats, zum Beispiel ist das Chinidinsalz der Östronsulfonsäure nicht zur Kystallisation zu bringen.

Auch die Umsetzung der Sulfonsäure mit Semicarbazidacetat verläuft ähnlich wie bei dem Ester; die Semicarbazone unterscheiden sich jedoch durch ihre Löslichkeit. Das Semicarbazon der Sulfonsäure ist als Na-Salz in Alkohol leichter und in Wasser schwerer löslich, auch zeigt hier bereits das Na-Salz keinen definierbaren Schmelz- oder Zersetzungspunkt mehr.

Die Beziehung der Sulfosäure zur Farbreaktion des Östrons

Die freie Östronsulfonsäure schmilzt unter Zersetzung. Während des Schmelzvorgangs färben sich die Kristalle tiefrot und aus der Schmelze wird ein Gas entwickelt, das reichlich Wasser und Schwefeldioxyd enthält. Bei längerem Erhitzen über den Zersetzungspunkt hinaus entfärbt sich die Schmelze besonders bei Zutritt der Luft wieder. Kühlt man die Schmelze aber schnell ab, so bleibt die rote Farbe erhalten und löst sich dann in den gleichen Lösungsmitteln, wie die Sulfonsäure, mit tiefroter Farbe auf. Diese Lösung ist nicht beständig; sie blaßt besonders in acetonischer und in Essigester-Lösung bald aus. Zutritt von Luft und Licht und vor allem Zusatz von Wasserstoffperoxyd beschleunigt diesen Vorgang. Die bei der Schmelze entstandene gefärbte Substanz verhält sich also in jeder Beziehung ebenso, wie die, welche bei der *Kober*schen Östronreaktion auftritt und man kann wohl annehmen, daß beide identisch sind, denn auch bei dem Erhitzen des Östrons in Schwefelsäure dürfte eine Sulfonsäure entstehen.

Die physiologische Wirksamkeit der Östronsulfonsäure

Die physiologische Prüfung der Östronsulfonsäure sowie ihre Dimethylverbindung im Allen-Doisy-Test ergab noch bei einer Dosis von 400 γ beziehungsweise 120 γ eine Unwirksamkeit der Stoffe.

Versuche zum Nachweis und zur Isolierung von Östronschwefelsäureester im Schwangerenharn und im Harn trächtiger Stuten

Auf Grund der an dem synthetisch bereiteten Östronschwefelsäureester gewonnenen Kenntnisse wurden nun die Versuche zur Anreicherung dieser Verbindung aus natürlichem Ausgangsmaterial wieder aufgenommen.

In Parallele zu der enzymatischen Spaltung des synthetischen Östronsulfats durch Phenolsulfatase wurde zunächst versucht, durch unmittelbare Einwirkung des Takadiastasepräparats auf neutralen Harn auch hier die Spaltung der wasserlöslichen Östronverbindung zu erreichen und damit einen Hinweis auf das Auftreten des Östronschwefelsäureesters zu erhalten. Daß die Phenolsulfatase auch im Harn zu wirken vermag, hat *Nogushi* (16) nachgewiesen. Ergebnisse, aus denen man sichere Schlüsse hätte ziehen können, wurden bei diesem Versuch jedoch nicht erreicht. Der Grund dafür ist wohl darin zu suchen, daß die enzymatische Spaltung der Phenolsulfate eine Gleichgewichtsreaktion ist und daß im Harn dieses Gleichgewicht in der Hauptsache durch die Spaltung anderer, in größerer Konzentration vorliegender Substrate erreicht wird, bevor die Einwirkung auf das Östronsulfat deutlich geworden ist.

Versuche zur Anreicherung von Östronsulfat aus Stutenharn und Schwangerenharn

Die Bemühungen, mit Hilfe eines Trennungsgangs, der unter Berücksichtigung der physikalischen und chemischen Eigenschaften des Östronschwefelsäureesters ausgearbeitet wurde, die Verbindung in reiner krystallisierter Form aus dem hormonhaltigen Harn zu gewinnen, führten leider nicht zu dem gewünschten Enderfolg. Die Versuche zeigten jedoch eindeutig, daß die wasserlösliche Östronverbindung sich stets in den Fraktionen befand, in denen sie auch nach den Eigenschaften des Östronsulfats erwartet werden mußte. Die bei der Aufarbeitung anfallenden östronhaltigen Fraktionen enthielten auch stets organisch gebundenes, leicht hydrolisierbares Sulfat. Schließlich gelang auf diesem Wege auch weitgehende Anreicherung östronhaltigen Materials. Diese Befunde, sowie auch die große Empfindlichkeit der wasserlöslichen Östronverbindung gegen H-Ionen, die die Arbeiten sehr erschwerte, machen es äußerst wahrscheinlich, daß Östron im Schwangerenharn und im Harn trächtiger Stuten mit Schwefelsäure verestert ausgeschieden wird.

Eine Bestätigung dieser Annahme wurde durch die Veröffentlichung von *Schachter* und *Marrian* (11) gegeben, in der sie, wie bereits erwähnt, die gelungene Isolierung einer geringen Menge von östronschwefelsaurem Kalium aus dem Harn einer trächtigen Stute mitteilten.

Die Arbeitsmethoden, die zur Anreicherung des Östronsulfats aus dem natürlichen Ausgangsmaterial dienten, waren gegeben durch seine Löslichkeit in Butanol und Aceton, seine Schwerlöslichkeit in Äther und Chloroform und die Schwerlöslich-

keit des Bariumsalzes in Wasser. Andere Eigenschaften, wie die Schwerlöslichkeit einiger Alkaloidsalze in Wasser und die Adsorbierbarkeit des Na-Salzes aus absolut äthanolischer Lösung an Al_2O_3 erwiesen sich als wenig oder gar nicht brauchbar für den Trennungsgang.

Die Methoden, die bei der Aufarbeitung verwendet wurden, waren folgende:

1. Die Extraktion aus wässriger Lösung mit Butanol

Durch mehrmaliges Ausschütteln mit Butanol wird die wasserlösliche Östronverbindung weitgehend der wässrigen Phase entzogen. Im Gegensatz zu der Östriolglucuronsäure wird sie aber durch Waschen mit verdünnter Natronlauge nicht wieder aus dem Butanol entfernt. Diese Eigenschaft gestattet es, die östronhaltige Fraktion von großen Mengen leicht wasserlöslicher und saurer Verbindungen zu befreien. Die zunächst tiefrotbraun gefärbten Butanolauszüge des Harns sind nach dem Waschen mit Natronlauge nur noch gelb gefärbt.

Die Haltbarkeit der Östronverbindung im Butanolextrakt ist auch noch bei einer Temperatur von 50 bis 60° ziemlich gut, wenn die Lösung nicht sauer oder stark alkalisch ist. Am günstigsten scheint dabei die sodaalkalische Reaktion zu sein, die man durch Ausschütteln des mit Natronlauge gewaschenen Extrakts mit gesättigter Bicarbonatlösung herstellt. Eine vorbehandelte Butanollösung kann unter dem Vakuum der Wasserstrahlpumpe in einem Wasserbad von rund 60° eingeengt werden, ohne daß sich dabei die Östronverbindung zersetzt. Die bei dem Einengen der Lösungen zunächst ausfallenden anorganischen Salze, die viel Soda und Bicarbonat enthalten, dürfen nicht abfiltriert werden, weil deren Pufferwirkungen die zuweilen auftretende Selbstzersetzung der Schwefelsäureester zurückhält. In Aufarbeitungen, in denen die anorganischen Salze vorzeitig entfernt wurden, trat meist die Spaltung der Schwefelsäureester während des Einengens der Lösung ein. Dies wird dadurch angezeigt, daß sich die Lösung tiefrot färbt, infolge der Oxydation des aus der Indoxylschwefelsäure freigewordenen Indoxyls zu Indigofarbstoffen.

2. Die Fällung aus acetonischer Lösung mit Äther

Aus den Trockenrückständen der Butanolextrakte läßt sich Östronsulfat dadurch abtrennen, daß man es zunächst in kaltem Aceton aufnimmt und diese Lösung sodann mit einem Überschuß von Äther fällt.

Bei der Lösung in Aceton bleiben die anorganischen Salze und auch einige störende Salze organischer Säuren, wie zum Beispiel das pregnandiolglucuronsaure Natrium des Schwangerenharns, zurück. Bei Zusatz von viel Äther fällt das östronhaltige Material aus, während andere organische Verbindungen, wie etwa die freien Hormone, unter diesen Umständen gelöst bleiben.

Diese Fällung, die aus dem Rückstand des Butanolauszuges durch Aufnehmen in Aceton und Fällen mit Äther erhalten wird, soll im Folgen-

den die Bezeichnung „Fällung A" erhalten. Daß mit Hilfe dieses Verfahrens der Östronschwefelsäureester aus wässrigen Lösungen abgetrennt werden kann, wurde dadurch bestätigt, daß eine Probe synthetisch bereiteten Östronsulfats, die hormonfreiem Harn zugesetzt wurde, nach der entsprechenden Aufarbeitung aus der Fällung A durch Fällung mit Chinidin in guter Ausbeute zurückgewonnen werden konnte.

Die Fällung A aus natürlichem Ausgangsmaterial enthält jedoch noch eine erhebliche Menge von Begleitstoffen. Von diesen machen sich andere Schwefelsäureester, vor allem die Indoxylschwefelsäure, durch ihre ähnlichen Löslichkeitsverhältnisse störend bemerkbar.

Das Verfahren zur Abtrennung der Indoxylschwefelsäure stützt sich auf deren größere Löslichkeit in organischen Lösungsmitteln.

Ätherextraktion aus der sauren wässerigen Lösung

Wird die schwach angesäuerte, wässrige Lösung der Fällung A mit Äther ausgeschüttelt, gelingt es bereits, einen Teil der störenden Begleitsubstanzen zu entfernen. Es ist hierbei darauf zu achten, daß dieser Teil der Aufarbeitung wegen der Zersetzlichkeit der Schwefelsäureester in saurer Lösung möglichst schnell und gegebenenfalls unter Kühlung erfolgt.

Zur weiteren Bearbeitung wird das östronhaltige Material der wässerigen Lösung wieder durch Ausschütteln mit Butanol entzogen und dieses unter den oben beschriebenen Bedingungen abgedampft.

Verteilung zwischen Chloroform und Wasser

Eine weitere Reinigungsmethode geht von der am synthetisch hergestellten Na-Östronsulfat beobachteten Schwerlöslichkeit in Chloroform aus. Aus dem Trockenrückstand des Butanol-Auszuges wird die östronhaltige Verbindung durch Aufnehmen in absolutem Äthanol zunächst von den anorganischen Salzen getrennt. Versetzt man diese Lösung nun mit einem großen Überschuß von Chloroform, so trübt sich das Gemisch infolge der Abscheidung von in Chloroform schwer löslichen Verbindungen. Durch Ausschütteln mit wenig Wasser lassen sich diese leicht aus dem Chloroform extrahieren.

Fällung mit Bariumchlorid aus wässeriger Lösung

Die Fällung des Östronschwefelsäureesters als Bariumsalz ist durch die merkliche Löslichkeit dieses Salzes in Wasser auf Konzentrate beschränkt. Sogar aus konzentrierten wässrigen Lösungen der Fällung A gelang es noch nicht, die östronhaltige Verbindung mit $BaCl_2$ zu fällen und es hat den Anschein, daß ein Überschuß des in Wasser leichter löslichen indoxylschwefelsauren Bariums die Fällung des östronschwefelsauren Bariums zurückhält. Erst nach Vorbehandlung der Fällung A in

den beiden soeben beschriebenen Verfahren wird die Östronverbindung durch einen Überschuß von Bariumchlorid aus der wässerigen Lösung gefällt.

Zur Entfernung des Bariums wird die Fällung in Butanol gelöst und diese Lösung mit etwas n/10 Schwefelsäure gewaschen. Nachfolgendes Waschen des Butanols mit verdünnter Natronlauge und Eindampfen der Lösung im Vakuum liefert wieder die entsprechenden Natriumsalze.

Nach Entfernung anorganischer Begleitstoffe durch Lösen des Rückstandes in Aceton und Fällen der acetonischen Lösung mit Äther erhält man nun eine Fällung, in der die Östronverbindung stark angereichert und frei von Begleitsubstanzen ist, die die direkte kolorimetrische Bestimmung stören. Diese Fällung wird im Folgenden als „Fällung B" bezeichnet.

Der Weg, der zu dieser Fällung führt, wird durch folgendes Schema wiedergegeben:

Harn

	mit Butanol extrahieren
wässerige Phase	Butanol
	mit 3% NaOH waschen, mit Bicarbonat und Wasser nachwaschen
wässerige Phasen	Butanol
	eindampfen und Rückstand mit Aceton ausziehen
unlöslicher Rückstand	Aceton
	mit der vierfachen Menge Äther fällen
Äther	Fällung A
	in Wasser lösen, ansäuern (kongo) mit Äther extrahieren
Äther	Wässerige Phase
	mit Butanol extrahieren, Butanol mit 3% NaOH usw. waschen
wässerige Phasen	Butanol
	eindampfen, in Alkohol aufnehmen
unlöslicher Rückstand	Alkohol
	mit Chloroform vers. und mit Wasser extrahieren
Chloroform	Wasser

Wasser	mit $BaCl_2$ fällen Ba-Fällung
wässerige Phase	in Butanol lösen, mit n/10 H_2SO_4 waschen, mit 3% NaOH waschen Butanol
unlöslicher Rückstand	eindampfen, mit Aceton ausziehen Aceton
Äther	mit Äther fällen Fällung B

Anwendbarkeit der kolorimetrischen Östronbestimmung nach Kober als Hilfsmittel zur Anreicherung von Östronsulfat aus Harn

Wie am synthetischen Östronsulfat gezeigt wurde, kann das Östron in dieser Verbindung unmittelbar durch die *Kober*sche Farbreaktion bestimmt werden. Bei der Anreicherung der Verbindung aus Harn ist dieses Verfahren jedoch erst bei den bereits weiter vorgereinigten Fraktionen möglich. Will man die ersten Fraktionsstufen auf ihren Östrongehalt quantitativ untersuchen, muß zuvor eine Hydrolyse vorgenommen werden und dann das freie Hormon bestimmt werden. Da aber die Werte, die man auf diesem Wege für die ersten Fraktionen erhält, noch sehr ungenau sind und zu hohe Zahlen ergeben, wurde hier nur mit Hilfe qualitativer Probereaktionen geprüft, ob die östronhaltige Verbindung in den Fraktionen sich befand, in denen sie nach den Eigenschaften des Östronsulfats erwartet werden mußte.

Schachter und *Marrian* haben bei ihren Versuchen für die Isolierung des Östronsulfats aus Harn auch in den ersten Fraktionen den Östrongehalt kolorimetrisch bestimmt, aber die von ihnen allerdings als nicht „strictly quantitative" angegebenen Zahlenwerte sind recht hoch und bestätigen die Vorbehalte, die bei der quantitativen Anwendung der Farbreaktion zu machen sind.

Auch für die vorgereinigten Fällungen ergibt die Methode nur Annäherungswerte, weil, besonders in Fällungen aus Stutenharn, nicht reine Östronverbindungen, sondern Gemische vorliegen, die wechselnde Mengen von Hormonen der Östrongruppe enthalten. Die Intensität der Farbreaktion der einzelnen Mitglieder dieser Gruppe ist aber verschieden groß. Trotz dieser Einschränkungen ist die Möglichkeit der kolorimetrischen Östronbestimmung während der Aufarbeitung von sehr großem Wert, weil dadurch die zeitraubenden Teste mit Hilfe des Tierversuchs entbehrlich werden.

Versuche zur weiteren Reinigung der Fällung B

Die Versuche, aus der Fällung B Fraktionen zu gewinnen, in denen das Östron noch weiter angereichert ist, gelangen nur in beschränktem Umfang, weil in allen Fällen schließlich Zersetzung eintrat.

Den besten Erfolg hatte dabei die fraktionierte Fällung der acetonischen Lösung mit Äther, bei der in den schwerfällbaren Anteilen eine wesentliche Vermehrung des Östrongehalts nachzuweisen war. In geringem Maße konnte auch durch Adsorption aus absolut äthanolischer Lösung an Aluminiumoxyd, nachfolgender Elution mit Methanol und Fällung mit viel Äther eine Anreicherung von Östron in den Fällungen bewirkt werden, die jedoch nur geringfügig war und in keinem Verhältnis zu den hierbei auftretenden Substanzverlusten stand.

Gänzlich ohne Erfolg blieben die Bemühungen, durch Fällung der wässrigen Lösungen mit Chinidin den Östronschwefelsäureester in krystallisierter Form abzutrennen. Selbst aus Fällungen, in denen nach der Farbbestimmung 78% Östronsulfat enthalten waren, wurden nur amorphe Chinidinfällungen erhalten. Dies bestätigt die immer wieder gemachten Erfahrungen, daß die Fällung mit Alkaloiden nicht zur Anreicherung der wasserlöslichen Östronverbindungen geeignet ist, anscheinend weil diese Reaktion zu unspezifisch ist.

Hydrolyse einer östronhaltigen Fällung

Bei der Hydrolyse einer Probe der Fällung B in n/10 Salzsäure wurde eine wasserunlösliche Substanz abgeschieden, die im Allen-Doisy-Test an der kastrierten Maus nur mit 0,25 g wirksam war. Der Schmelzpunkt dieser Substanz stieg nach einmaligem Umkrystallisieren von 180 bis 190° auf 218 bis 224°, blieb also sehr unscharf. Dies deutet darauf hin, daß in der Fällung B ein Gemisch sehr ähnlich gebauter Stoffe vorliegt, deren Trennung wegen der Zersetzlichkeit der Verbindungen außerordentlich schwierig sein dürfte.

Diese Eigenschaft, sowie die große Verschiedenheit des Ausgangsmaterials — *Schachter* und *Marrian* verwendeten für die Aufarbeitung, aus der sie krystallisiertes Östronsulfat erhielten, den Harn von nur einer Stute — haben zur Folge, daß es kaum möglich sein dürfte, aus natürlichem Ausgangsmaterial den Schwefelsäureester des Östrons in genügender Menge und Reinheit darzustellen, um damit Versuche auszuführen, in denen geprüft werden kann, ob dieser wasserlöslichen Östronverbindung eine Rolle im Mechanismus der Hormonwirkung zukommt, oder ob sie allein als Ausscheidungsform der Entfernung überschüssigen Hormons dient.

Nachdem eine vollkommene Analogie der chemischen und physiologischen Eigenschaften der wasserlöslichen Östronverbindung des Schwangerenharns und des Harns trächtiger Stuten mit denen des synthetisch dargestellten Östronschwefelsauren Natriums festgestellt werden konnte,

und die Gleichheit beider Verbindungen, besonders auch unter Berücksichtigung der Ergebnisse der Arbeiten von *Schachter* und *Marrian* (11) als sicher gelten kann, ist, da Östronsulfat synthetisch leicht zugänglich ist, die Voraussetzung für Untersuchungen über die physiologische Bedeutung dieser Hormonverbindung gegeben.

Beschreibung der Versuche

Darstellung des östronschwefelsauren Natriums

570 mg Östron wurden in 10 ccm trocknem Pyridin gelöst. Die Lösung wurde mit 20 ccm trocknem Chloroform verdünnt und mit einer Lösung von 0,16 ccm Chlorsulfonsäure in 10 ccm Chloroform, die unter Kühlung mit 5 ccm Pyridin versetzt worden war, vermischt und einen Tag bei Zimmertemperatur stehen gelassen; dabei waren die sich zunächst in der Lösung bildenden Krystalle von Pyridinsalzen wieder in Lösung gegangen. Die schwach gelb gefärbte Lösung wurde dann im Wasserbad von 40° bis 50° unter dem Vakuum der Wasserstrahlpumpe eingeengt, bis die Hauptmenge des Pyridins entfernt war. Das zurückbleibende braunrote Öl wurde mit 50 ccm trockenem Äther übergossen und einen Tag in den Eisschrank gestellt. Der überstehende Äther wurde dann abgegossen, der rötlichweiße Rückstand mit etwas Äther nachgewaschen, filtriert und sogleich in 20 ccm Methanol gelöst. Die methylalkoholische Lösung wurde allmählich mit n-methylalkoholischer Natronlauge versetzt bis Lackmus-Papier eben gebläut wurde. Dabei fielen bereits anorganische Salze als flockiger Niederschlag aus. Die Lösung wurde dann mit 30 ccm Äther versetzt, gut durchgeschüttelt und filtriert. Der Filterrückstand wurde mit einem Gemisch von Äther-Methanol 2 : 1 nachgewaschen und das Filtrat mit weiteren 300 ccm Äther versetzt. Die Lösung trübte sich dabei unter Ausscheidung einer krystallinen Fällung von östronschwefelsaurem Natrium. Nach eintägigem Stehen im Eisschrank wurde die Rohfällung von der nunmehr klaren Lösung abfiltriert und im Vakuumexsiccator über Schwefelsäure getrocknet. Die Rohausbeute betrug 662 mg. Zur Reinigung wurden die Krystalle wieder in Methanol gelöst, die Lösung mit etwas Tierkohle geschüttelt, filtriert und wieder mit Äther gefällt. Das Na-Salz der Östronschwefelsäure lag dann in farblosen Nadeln vom Smp. 228° bis 230° (korr.) vor.

4,231 mg Sbst: 8,540 mg CO_2, 2,100 mg H_2O
5,050 mg Sbst: 3,090 mg $BaSO_4$
$C_{18}H_{21}O_5SNa \cdot 1 H_2O$
Ber.: C 55,40%, H 5,68% S 8,21%
Gef.: C 55,07%, H 5,55% S 8,40%

Pyridinsalz der Östronschwefelsäure

Aus einem Ansatz von 540 mg Östron und 0,16 ccm Chlorsulfonsäure krystallisierten vor dem Neutralisieren mit methylalkoholischer

Natronlauge 173 mg Pyridinsalz der Östronschwefelsäure aus. Nach dem Umkrystallisieren aus Methanol betrug der Schmelzpunkt 173° bis 175° (korr.).

3,617 mg Sbst.: 8,525 mg CO_2, 2,080 mg H_2O;
5,798 mg Sbst.: 3,090 mg $BaSO_4$
C_{23} H_{27} O_5 S N
Ber.: C 64,31%, H 6,34%, S 7,46%
Gef.: C 64,38%, H 6,44%, S 7,32%

Fällung des Östronsulfats mit Alkaloiden

50 mg östronschwefelsaures Natrium, gelöst in 20 ccm Wasser, wurden mit einem Überschuß einer wässrigen Lösung von Chininhydrochlorid versetzt. Es fiel ein flockiger Niederschlag von 81,8 mg des Chininsalzes, das auch beim Umlösen nicht krystallisierte. Durch Umfällen aus Aceton-Äther stieg der Smp. auf 168° bis 170°.

40 mg Natriumöstronsulfat wurden in 8 ccm Wasser gelöst und mit einer Lösung von 50 mg Chinidinhydrochlorid in 8 ccm Wasser gefällt. Nach dem Abfiltrieren wog die über Calciumchlorid getrocknete Fällung 63 mg; das entspricht einer Ausbeute von 85% unter Berücksichtigung eines Krystallwassergehaltes von 3 Mol. Wasser. Nach dem Umkrystallisieren aus Aceton-Wasser wurden farblose Nadeln vom Smp. 167° bis 170° erhalten.

4,708 mg Sbst.: 10,805 mg CO_2, 2,907 mg H_2O;
3,060 mg Sbst.: 0,099 ccm N (25,5°, 759 mm)
C_{38} $H_{64}O_7N_2S \cdot 3\ H_2O$
Ber.: C 62,61%, H 7,19%, N 3,84%
Gef.: C 62,62%, H 7,06%, N 3,70%

Östronbestimmung: 2,0 mg des Chinidinsalzes wurden in 50 ccm Methanol gelöst. Mit 0,2 ccm und 0,3 ccm der Lösung (entsprechend 10 γ und 15 γ Subst.) wurde die kolorimetrische Östronbestimmung durchgeführt.

10 γ Sbst. enthalten 3,7 γ Östron (berechnet: 3,7 γ)
15 γ Sbst. enthalten 5,5 γ Östron (berechnet: 5,6 γ)

Fällung des Östronsulfats mit Bariumchlorid

10 mg östronschwefelsaures Natrium, in 5 ccm Wasser gelöst, wurden mit 0,1 ccm gesättigter Bariumchloridlösung versetzt. Die flockige Fällung wog nach dem Abfiltrieren und Trocknen über Calciumchlorid 6,2 mg, das ist 58% der berechneten Menge.

Semicarbazon des östronschwefelsauren Natriums

115 mg östronschwefelsaures Natrium wurden in 25 ccm abs. Alkohol gelöst und mit einer überschüssigen alkoholischen Lösung von Semicarbazidacetat versetzt und eine Stunde auf dem Wasserbad erhitzt. Nach eintägigem Stehen hatte sich eine amorphe Fällung gebildet, die abfiltriert

und mit viel kaltem Alkohol gewaschen wurde: 68,4 mg Semicarbazon vom Zers.p. 258° bis 160°. Das Semicarbazon ist ziemlich leicht wasserlöslich und kann aus wässiger Lösung mit Bariumchlorid ausgefällt werden. Die amorphe Bariumsalzfällung wurde aus der Hülse mit wenig Methanol umkrystallisiert und in farblosen Prismen erhalten, die keinen definierbaren Schmelz- oder Zers.punkt zeigen.

Spaltung des östronschwefelsauren Natriums

Mit verdünnter Säure: 25 mg östronschwefelsaures Natrium wurden in 25 ccm n/10 Salzsäure gelöst und eine Stunde auf dem Wasserbad erhitzt. Es bildete sich eine flockige Fällung, die abfiltriert, über Calciumchlorid getrocknet und gewogen wurde: 16,3 mg Östron; Smp. nach einmaligem Umkrystallisieren aus Methanol 252°, Wirksamkeit im Allen-Doisy-Test an der Maus: 0,1 γ : 66,6%, 0,125 γ : 100%.

In neutraler Lösung durch Takadiastase:

30 mg östronschwefelsaures Natrium wurden in 10 ccm Wasser gelöst, mit 100 mg Bariumcarbonat versetzt und mit einer Suspension von 30 mg Takadiastase in 10 ccm Wasser vermischt. Die Mischung wurde in einem Brutschrank bei 37° aufbewahrt. Zum Vergleich wurde ein Blindversuch angesetzt, in dem 30 mg östronschwefelsaures Natrium in 20 ccm Wasser gelöst und mit 100 mg Bariumcarbonat versetzt wurde. Die Versuche wurden je nach 4, 8 und 16 Stunden abgebrochen. Nach Beendigung des Versuchs wurde die Reaktionslösung in 100 ccm Aceton eingegossen und nach mehrstündigem Stehen in der Kälte von dem Bariumcarbonat und den ausgefallenen Eiweißstoffen abfiltriert. Die Lösung wurde unter vermindertem Druck vorsichtig bis auf 10 ccm eingeengt. Dabei schied sich das freie Östron als flockiger Niederschlag ab, es wurde abfiltriert, mit Wasser gewaschen und nach dem Trocknen in Aceton gelöst. Der Rückstand der Acetonlösung wurde gewogen.

Das wässrige Filtrat wurde mit Salzsäure auf $p_H = 1$ gebracht und eine Stunde auf dem Wasserbad erhitzt. Das dabei abgeschiedene Östron wurde abfiltriert und wie oben behandelt.

Tabelle

Versuch	Einwage		Versuchs-dauer	Östron		Östron-sulfat	
	Natriumsalz d. Östron-sulfats	Taka-diastase		mg	%	mg	%
1	30,6 mg	30,2 mg	4 Std.	12,1	49	11,6	51
2	33,9 mg	30,0 mg	8 Std.	14,1	58	10,2	42
3	34,4 mg	33,5 mg	16 Std.	25,7	88	3,5	12
V	27,2 mg	0 mg	16 Std.	2,8	13	18,6	87

Zurückgewinnung von Natrium-Östronsulfat aus östronfreiem Harn

100mg Natrium-Östronsulfat wurden in 10 ccm Wasser gelöst und mit 500 ccm östronfreiem Harn vermischt. Die Lösung wurde viermal mit 150 ccm Butanol ausgezogen, dreimal mit 100 ccm 3%iger Natronlauge gewaschen und je einmal mit gesättigter Natriumbicarbonatlösung und Wasser gewaschen. Die Lösung wurde im Vakuum zur Trockne gedampft, zweimal mit 25 ccm kaltem Aceton ausgezogen und die acetonische Lösung dann mit 500 ccm Äther gefällt. Nach eintägigem Stehen in der Kälte wurde der Äther von der flockigen Fällung dekantiert und die abgetrennte Fällung in 30 ccm Wasser gelöst. Diese Lösung wurde mit einem Überschuß einer gesättigten Lösung von Chinidin-Hydrochlorid versetzt und der entstandene Niederschlag aus Aceton-Wasser umkrystallisiert. Es wurden 162 mg des krystallinen Chinidinsalzes erhalten, das einen Schmelzpunkt von 157° bis 161° und einen Östrongehalt von 33% zeigte. Die Fällung bestand also nicht aus ganz reinem Chinidin-Östronsulfat.

Einwirkung gärender Hefe auf Natrium-Östronsulfat

200 mg östronschwefelsaures Natrium wurden in 100 ccm Wasser gelöst und zu einer in voller Gärung befindlichen Lösung von 20 g Zucker in 200 ccm Wasser mit 10 g Bäckerhefe gegossen. Man läßt die Gärung unter öfterem Umschütteln bei Zimmertemperatur vor sich gehen und facht sie nach drei Tagen, wenn die Hauptgärung vorüber ist, noch einmal durch Zusatz von 10 g Zucker an. Nach fünf Tagen Gärdauer wurde die Lösung in einen Scheidetrichter gegossen, viermal mit 200 ccm Äther ausgeschüttelt, die Ätherlösung mit 10%iger Sodalösung gewaschen und zur Trockne gedampft. Es hinterblieben nur geringfügige Spuren einer durch ein rotes Öl verunreinigten Masse.

Die ausgeätherte Lösung wurde nun viermal mit 100 ccm Butanol ausgeschüttelt, die vereinigten Butonalauszüge dreimal mit 100 ccm 3%iger Natronlauge gewaschen, einmal mit 100 ccm gesättigter Bicarbonatlösung und einmal mit 100 ccm Wasser nachgewaschen und unter vermindertem Druck zur Trockne gedampft. Der Rückstand wurde zweimal mit je 50 ccm kaltem Aceton ausgezogen. Die filtrierte, zunächst klare Acetonlösung trübte sich nach kurzem Stehen. Der neuentstandene Niederschlag wurde wieder abfiltriert. Er war wasserlöslich, östronfrei und gab eine positive Sulfatreaktion, er bestand also aus Natriumsulfat. Nach dem Einengen krystallisierten aus der Acetonlösung 95 mg Östron, das durch den Smp. von 254° und durch die physiologische Prüfung im Allen-Doisy-Test charakterisiert wurde.

Darstellung der Östronsulfonsäure

420 mg Östron wurden in 100 ccm Chloroform gelöst und mit 100 ccm Tetrachlorkohlenstoff verdünnt. Dazu wurde eine

Lösung von 0,1 ccm Chlorsulfonsäure in 10 ccm Chloroform und 2 ccm Äther gegossen. Nach halbstündigem Kochen unter Rückfluß wurde das Lösungsmittel bis auf wenige ccm abdestilliert und der Rest des Lösungsmittels unter vermindertem Druck entfernt. Der braunrote Rückstand wurde in möglichst wenig trockenem Essigester gelöst. Die stark gefärbte Lösung wurde mit etwas Tierkohle versetzt und nach kurzem Erwärmen auf dem Wasserbad filtriert. Das nur noch schwach gefärbte Filtrat wurde durch allmählichen Zusatz von Petroläther (80° bis 90°) gefällt. Nach einmaliger Wiederholung der Fällung aus Essigester-Petroläther wurden 430 mg einer farblosen, in winzigen Drusen krystallisierenden Sulfonsäure vom Schmelzpunkt 202° bis 203° erhalten; nach wiederholtem Umfällen stieg der Schmelzpunkt bis auf etwa 210°.

4,449 mg Sbst: 2,785 mg $BaSO_4$
Ber.: S 8,72%, Gef.: S 8,60%.

Methylierung der Östronsulfonsäure

74 mg der Sulfonsäure wurden in 15 ccm Essigester gelöst; in die mit 15 ccm Äther verdünnte Lösung wurde ein Überschuß einer ätherischen Diazomethan-Lösung eindestilliert. Nach eintägigem Stehen bei Zimmertemperatur wurde das Lösungsmittel abdestilliert und der farblose, krystalline Rückstand aus Methanol umgelöst. Es wurden 46 mg der methylierten Verbindung in glänzenden rhombischen Blättchen vom Schmelzpunkt 197° erhalten, die nach wiederholtem Umkrystallisieren aus Methanol nach dem Sintern bei 197° noch einmal erstarren und bei 207° wieder schmelzen.

4,839 mg Sbst.: 11,195 mg CO_2, 2,960 mg H_2O;
3,219 mg Sbst.:
3,925 mg AgJ; 4,121 mg Sbst.: 2,570 mg $BaSO_4$
$C_{20}H_{26}O_5S$ Ber.: C 63,47%, H 6,92%, O 16,40%, S 8,46%
Gef.: C 63,40%, H 6,87%, OCH_3 16,12%, S 8,56%

Aufarbeitung von Stutenharn

20 l Mischharn von Stuten im neunten und zehnten Monat der Trächtigkeit wurden zweimal mit 5 l Butanol ausgeschüttelt, sodann mit 4 kg Kochsalz versetzt und nochmals zweimal mit 5 l Butanol extrahiert. Die vereinigten Butanolextrakte wurden durch Zentrifugieren geklärt und dann dreimal mit je 2 l 3%iger Natronlauge gewaschen, einmal mit 4 l gesättigter Natriumbicarbonatlösung und einmal mit 4 l Wasser nachgewaschen. Die zurückbleibende, schwach gelb gefärbte Butanollösung wurde in einem Wasserbad von 50° bis 55° unter vermindertem Druck zur Trockne gedampft. Der Rückstand wurde mit kaltem Aceton aufgenommen und solange weiter mit Aceton versetzt, bis keine flockige Fällung mehr auftrat. Nach dem Abfiltrieren wurde der in Aceton unlösliche

Rückstand noch einmal mit ½ l Aceton nachgewaschen und die gesamte Acetonlösung, etwa 2 l, mit 6 l Äther gefällt. Nach eintägigem Stehen hatte sich ein teils flockiger, teils krystallisierter Niederschlag abgeschieden, der viel indoxylschwefelsaures Natrium enthielt. Nach dem Dekantieren der überstehenden, klaren Aceton-Ätherlösung wurde der Rückstand filtriert und mit etwas Äther nachgewaschen. Der noch ätherfeuchte Niederschlag wurde dann in ½ l Wasser gelöst und die Lösung unter Eiskühlung mit Salzsäure eben kongosauer gemacht. Diese Lösung wurde wiederholt mit Äther ausgeschüttelt, bis die überstehende Ätherlösung farblos blieb. Die wässrige Lösung wurde nun viermal mit 150 ccm Butanol ausgezogen, der Butanolextrakt dreimal mit 3%iger Natronlauge, einmal mit gesättigter Bicarbonatlösung und einmal mit Wasser gewaschen und schließlich wieder im Vakuum zur Trockne gedampft. Der Rückstand wurde nun mit insgesamt 60 ccm abs. Alkohol ausgezogen und die filtrierte alkoholische Lösung mit 1 l Chloroform versetzt. Diese Lösung wurde viermal mit je 50 ccm Wasser ausgeschüttelt und der wässrige Extrakt zur Entfernung von Lösungsmittelresten mit dem gleichen Volumen Äther gewaschen. Die wässrige Lösung wurde jetzt mit heiß gesättigter Bariumchloridlösung versetzt, bis sich ein Niederschlag bildete. Die rötlich gefärbte, flockige Fällung hatte sich nach eintägigem Stehen am Boden des Gefäßes abgesetzt. Die überstehende Lösung wurde abgegossen, der Niederschlag mit 50 ccm eiskaltem Wasser nachgewaschen und abfiltriert. Die Bariumfällung wurde möglichst vollständig von anhaftendem Wasser befreit und dann mit 200 ccm Butanol aus dem Filter herausgelöst. Zur Entfernung des Bariums wurde die Butanollösung dreimal mit 50 ccm n/10 Schwefelsäure ausgeschüttelt und das Butanol durch Waschen mit Natronlauge wieder alkalisch gemacht. Nach dem üblichen Waschen mit Bicarbonat und Wasser wurde die Butanollösung im Vakuum zur Trockne gedampft.

Der Rückstand wurde mit 50 ccm kaltem Aceton gut verrieben und die filtrierte Lösung vorsichtig mit etwas Äther versetzt. Dabei entstand zunächst eine flockige Fällung, die nur wenig Östron, aber einen großen Teil rötlich gefärbter Verunreinigungen enthielt. Nach Zugabe von 50 ccm Äther war die Lösung fast farblos geworden und aus dieser Lösung bildete sich nach Zugabe von weiteren 500 ccm Äther eine fast weiße, pulverige Fällung (Fällung B). Ihr Gewicht betrug 438 mg. Die Östronbestimmung nach *Kober* ergab folgende Werte:

10,2 γ der Fällung enthielten 3,4 γ Östron
15,3 γ der Fällung enthielten 5,3 γ Östron
20,4 γ der Fällung enthielten 7,0 γ Östron

das entspricht einem Östrongehalt von 34,2% und da reines Natriumöstronsulfat 69% Östron enthält einem Gehalt von 49,5% Natriumöstronsulfat.

Von dieser Fällung wurden 21 mg in 10 ccm n/10 Salzsäure eine Stunde lang auf dem Wasserbad erhitzt. Dabei entstand eine flockige Fäl-

lung, die abfiltriert, getrocknet und gewogen wurde. Aus 21 mg Substanz entsanden bei der Hydrolyse 7,6 mg wasserunlösliche Anteile, das sind 36,2% des Ausgangsmaterials. Der Schmelzpunkt lag zwischen 180° und 190° und die Wirksamkeit im Allen-Doisy-Test ergab sich zu 2,5 γ. Nach einmaligem Umkrystallisieren aus Methanol stieg der Schmelzpunkt auf ungefähr 220°, die physiologische Wirksamkeit erhöhte sich nicht wesentlich.

Aus der nach der Hydrolyse zurückbleibenden wässrigen Lösung wurden durch Fällung mit Bariumchlorid 7,9 mg Bariumsulfat erhalten.

Fraktionierung der Fällung B

192 mg der Fällung B wurden in 20 ccm kaltem Aceton gelöst und mit 10 ccm Äther versetzt. Es entstand zunächst ein flockiger Niederschlag, der nur eine geringe Östronreaktion zeigte.

Durch weiteres Fällen mit 30 ccm Äther wurden 61 mg einer Fällung abgetrennt, deren Östrongehalt gegenüber der Fällung B fast unverändert war.

20 γ Fällung enthielten 6,8 γ Östron,
das entspricht einem Östrongehalt von 34%.

Der Zusatz von 200 ccm Äther zur Mutterlauge ergab schließlich eine Restfällung von 57 mg, in der der Östrongehalt auf 54,1% gestiegen war, das entspricht einem Gehalt an Natriumöstronsulfat von 78,5%. Östronbestimmung:

8 γ Fällung enthielten 4,3 γ Östron
16 γ Fällung enthielten 8,7 γ Östron

Bei dem Versuch, diese Fällung durch Fraktionierung aus Butanol-Äther weiter zu reinigen, trat Zersetzung ein.

Chromatographie der Fällung B

200 mg der Fällung wurden in 50 ccm abs. Äthylalkohol gelöst und durch eine Säule von Aluminiumoxyd *(Brockmann)* filtriert, deren Höhe 15 cm, deren Durchmesser 1 cm betrug. Es wurde mit 75 ccm Äthylalkohol nachgewaschen. Nach dem Eindampfen des Äthylalkohols blieben nur geringe Spuren Substanz zurück. Die Fällung war also fast vollständig am Aluminiumoxyd zurückgehalten worden. Sie wurde mit 50 ccm Methanol herausgelöst und mit 500 ccm Äther gefällt. Das Gewicht der Fällung betrug 127 mg. Östronbestimmung:

17 γ Fällung enthielten 6,4 γ Östron
34 γ Fällung enthielten 13,2 γ Östron
17 γ Fällung enthielten 6,8 γ Östron

Mittel: 38,8% Östron entsprechen 58% Natriumöstronsulfat. Es hatte also nur eine geringe Anreicherung der Östronverbindung stattgefunden.

Diese Fällung zersetzte sich gleichfalls bei weiteren Versuchen zur Reinigung.

Physiologische Prüfung der Schwefelsäureverbindungen des Östrons

verabfolgt in	Dosis in γ	Anzahl der Tiere	mit Vollbrunst	%
Östronschwefelsaures Natrium				
öliger Lösung subkutan	20,0	7	7	100
	13,3	7	6	85,7
	10,0	7	5	71,5
	1,0	7	—	0
wässriger Lösung oral	10,0	6	4	56,6
	2,0	6	3	50,0
Östronschwefelsaures Pyridin				
öliger Lösung subkutan	2,0	6	6	100
	1,0	6	6	100
	0,5	6	3	50
Ringerlösung subkutan	5,0	6	5	83,4
	2,0	6	5	83,4
	1,0	6	3	50
	0,5	6	2	33,3
Stärkelösung oral	5,0	5	4	80
	2,0	6	4	66,6
	1,0	4	2	50
	0,5	6	2	33,3
Östronschwefelsaures Chinidin				
öliger Lösung subkutan	20,0	7	7	100
	10,0	7	6	85,6
	5,0	7	4	57,2
Östronsulfonsaure				
Ringerlösung subkutan	400	6	—	0
Dimethylverbindung der Östronsulfonsaure				
öliger Lösung subkutan	120	6	—	0

Literaturverzeichnis

1. *E. M. Venning* und *J. S. L. Browne:* Proc. Soc. Exper. Biol. a Med. **34**, 792 (1936).
2. *S. L. Cohen* und *G. F. Marrian:* Biochemic. Journ. **30**, 57 (1936).
2a. Biochemic. Journ. **30**, 2250 (1936).
3. *G. F. Marrian:* Nature **125**, 90 (1930).
4. *E. A. Doisy, C. D. Veler* und *S. A. Thayer:* Journ. Biol. Chem. **86**, 499 (1930)
5. *S. L. Cohen* und *G. F. Marrian:* Biochemic. Journ. **29**, 1577 (1935).
6. *O. Mühlbock:* Z. physiol. Chem. **250**, 139 (1937)
7. *B. Schachter* und *G. F. Marrian:* Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med. **35**, 222 (1936).
8. *S. Kober:* Biochem. Z. **239**, 209 (1931).
9. *S. L. Cohen* und *G. F. Marrian:* Biochemic. Journ. **28**, 1603 (1934).
10. *S. Kober:* Biochemic. Journ. **32**, 357 (1938).
11. *B. Schachter* und *G. F. Marrian:* Journ. Biol. Chem. **126**, 663 (1938).
12. *C. Fromageot:* Erg. Enzymforsch. Bd. VII, 50 (1938).
13. *W. John:* Z. physiol. Chem. **250**, 18 (1937).
14. *A. Butenandt:* Z. physiol. Chem. **191**, 140 (1930); *K. Miescher, C. Scholz* und *E. Tschopp,* Biochemic. Journ. **32**, 141 (1938).
15. *L. Mamoli:* Ber. 71 2696 (1938).
16. *J. Nogushi:* Biochem. Z. **143**, 186 (1923).

Lebenslauf

Am 21. September 1912 wurde ich, *Heinrich Hofstetter,* als Sohn des damaligen Oberleutnants *Bernhard Hofstetter* und seiner Ehefrau Gertraut, geb. Rumpf, zu Freiburg (Breisgau) geboren.

Meine Schulausbildung erhielt ich in Potsdam, wo ich von Ostern 1921 bis Herbst 1922 das Viktoriagymnasium und von Herbst 1922 an das Realgymnasium besuchte. Dort legte ich Ostern 1931 die Reifeprüfung ab.

Im Sommersemester 1931 studierte ich zunächst ein Semester Medizin an der Universität Berlin und trat dann zur philosophischen Fakultät über, um Chemie zu studieren. Im Sommersemester 1932 war ich Famulus, im Sommersemester 1933 Hilfsassistent in der anorganischen Abteilung des I. Chemischen Instituts der Universität Berlin.

Das 1. Verbandsexamen legte ich im Januar 1933 und den 1. Teil des 2. Verbandsexamens im Juni 1935 bei Herrn Prof. *W. Schlenk* ab.

In der Zeit vom Juli 1935 bis Oktober 1935 führte ich bei Herrn *Dr. F. F. Nord* biochemische Untersuchungen über die alkoholische Gärung aus (veröffentlicht: Biochemische Zeitschrift Bd. 285, S. 242).

Vom Herbst 1935 bis zum Herbst 1936 diente ich als Freiwilliger bei dem Inf.-Rgt. 33 in Zerbst. Nach der Entlassung aus dem Wehrdienst erledigte ich am Physikalisch-Chemischen Institut der Universität Berlin die physikalisch-chemischen Übungen und legte dort im Mai 1937 bei Herrn Prof. *Günther* den 2. Teil des 2. Verbandsexamens ab. Daneben setzte ich die im Jahre 1935 bei Dr. *Nord* begonnenen Arbeiten fort (veröffentlicht: Biochemische Zeitschrift Bd. 293, S. 231 und Bd. 295, S. 414).

Seit dem Mai 1937 war ich mit den Arbeiten zu der vorliegenden Dissertation am Kaiser-Wilhelm-Institut für Biochemie in Berlin-Dahlem beschäftigt.